

КОРМИЛЬЦЕВА ИННА ПЕТРОВНА

**ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЧЕРНОЗЕМА ВЫЩЕЛОЧЕННОГО ПРИ ВНЕСЕНИИ
2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Куриненко Борис Михайлович

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор
Селивановская Светлана Юрьевна

Доктор биологических наук
Коксин Владимир Петрович

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и
биофизики КНЦ РАН

Защита состоится «9» июня 2011г. в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском государственном университете.

.

Автореферат разослан « » мая 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Интенсивное развитие военного комплекса и применение в качестве основы большинства взрывчатых веществ 2,4,6-тринитротолуола привели к значительному загрязнению отдельных территорий. Время загрязнения некоторых из них датируется периодом Второй Мировой войны [Lewis *et al.*, 2004; Wilkstrom *et al.*, 2000]. Места концентрации загрязнения обладают дополнительным повреждающим воздействием и проблема не ограничивается контаминацией только территорий, на которых расположены или располагались военные объекты. На производстве и при детонации заряда загрязнению подвергается также атмосферный воздух, который потом становится источником вторичного загрязнения почв. При миграции ксенобиотика происходит попадание ТНТ в грунтовые воды, а с ними – в крупные водоемы [Voopathy, 2000].

Результатом присутствия высокотоксичного и персистентного взрывчатого соединения ТНТ в подземных водах, почве, воздухе и осадочных породах стало экстенсивное загрязнение по всему миру и на сегодняшний день ТНТ представляет собой один из важнейших загрязнителей окружающей среды.

Главным компонентом ландшафта, депонирующим ксенобиотики, является почвенный покров. Зачастую ТНТ находится даже в тех почвах, где присутствовать не должен и где его нахождение невозможно объяснить. Нитроароматические углеводороды, включая ТНТ, как стойкие органические соединения внесены в списки приоритетных загрязнителей, как Европейского сообщества (ЕС), так и Агентства по охране окружающей среды США (EPA) [Яковлева Е.В. с соавт., 2008].

Очевидно, назрела необходимость разработки эффективных и безопасных методов ремедиации загрязненных ТНТ почв. Для надежного теоретического и прикладного обоснования методов ремедиации необходимо знание о влиянии ТНТ на биологическую активность почвы.

В доступной нам литературе приводятся попытки оценки биологической активности почв, загрязненных ТНТ. Эти работы фокусируются преимущественно на отдельных биохимических процессах. Например, было показано, что в почвах длительно или относительно недавно загрязненных ТНТ даже при низком уровне загрязнения угнетаются основные ферментативные активности (дегидрогеназная и азотфиксирующая активности) [Gong *et al.*, 1999; Siciliano *et al.*, 2000]. К сожалению, в литературе приводятся данные по одноразовому определению тех или иных параметров биологической активности почвы [Travis *et al.*, 2007]. Мы считаем, что исследования подобного рода должны проводиться в течение продолжительного срока, только они имеют теоретическое и практическое значение.

Цель и задачи исследования.

Провести интегральную оценку изменения биологической активности чернозема выщелоченного после внесения 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) *in vitro*.

В задачи исследования входило:

1. Оценить влияние 2,4,6-тринитротолуола на эколого-трофические группы микроорганизмов и микробную биомассу почвы;
2. Оценить изменения активности ферментов, азотфиксации и дыхания после загрязнения почвы 2,4,6-тринитротолуолом;
3. Охарактеризовать качественное и количественное изменение структуры комплекса микромицетов и оценить устойчивость к 2,4,6-тринитротолуолу микромицетов, занимающих в популяции загрязненной ксенобиотиком почвы доминирующее положение;
4. Оценить генотоксические свойства почвы, загрязненной 2,4,6-тринитротолуолом;
5. Охарактеризовать динамику содержания в загрязненной почве 2,4,6-тринитротолуола, экстрагируемого водой и ацетонитрилом, а также основных продуктов его метаболизма.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование динамики изменения основных параметров биологической активности почвы, контаминированной тринитротолуолом. Установлено, что из исследованных групп микроорганизмов наиболее чувствительными к ТНТ оказались нитрификаторы и денитрификаторы.

Впервые показано, что при высоких загрязняющих концентрациях ТНТ (100 и 200 мг/кг) в почве возрастает интенсивность процессов минерализации. Впервые в загрязненных ТНТ почвах проанализированы два класса ферментов – оксидоредуктазы и гидролазы. Продемонстрирована большая чувствительность последних, в особенности уреазы, к загрязнению концентрациями ТНТ свыше 50 мг/кг. Кроме того, показана высокая чувствительность микромицетов. Расчет частоты встречаемости микромицетов в загрязненных образцах обнаружил доминирование небольшого количества устойчивых штаммов, среди которых - возбудители заболеваний растений и условно патогенные для человека микромицеты.

Определено содержание экстрагируемой фракции поллютанта и его основных метаболитов в динамике, а также на протяжении всего периода наблюдений проведено изучение генотоксичности почвенных экстрактов.

Практическая значимость работы. Полученные в работе данные предполагают их применение при диагностировании интенсивности почвенного загрязнения 2,4,6-тринитротолуолом. Высокая чувствительность к загрязнению ТНТ гидролаз и микромицетов и зависимость частоты встречаемости последних от степени загрязнения может быть использована для оценки интенсивности загрязнения.

Установлено, что при отсутствии возобновляемого загрязнения ТНТ и содержания его в почве в количестве не более 100 мг/кг аборигенная микрофлора способна справиться с токсическим стрессом. При наличии в почве ТНТ в количестве, превышающем его растворимость, на первом этапе

целесообразно проведение предварительной ремедиации с использованием инженерно-экологических методов.

Положения, выносимые на защиту.

- Антропогенное загрязнение 2,4,6-тринитротолуолом приводит к изменению количественного соотношения членов бактериального сообщества чернозема выщелоченного, а также к изменению активности ферментов почвы. Главными мишенями воздействия 2,4,6-тринитротолуола являются денитрифицирующие и нитрифицирующие бактерии, а также гидролитические ферменты почвы (уреаза и протеаза).
- Внесение 2,4,6-тринитротолуола в чернозем выщелоченный нарушает структуру комплекса микромицетов в сторону снижения его разнообразия за счет элиминации типичных редких и случайных родов и возрастания частоты встречаемости (ЧВ) родов, содержащих фитопатогенные микромицеты.
- Внесение 2,4,6-тринитротолуола в чернозем выщелоченный сопровождается как сорбцией, так и восстановительной трансформацией ксенобиотика вследствие чего количество экстрагируемого 2,4,6-тринитротолуола в течение эксперимента снижается.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на III международной конференции «Микробное разнообразие: нынешняя ситуация, стратегия взаимодействия, битехнологический потенциал» (ICOMID 2008) (Пермь-Н.Новород-Пермь, 2008), XIV Международной конференции, посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным университетом и Гиссенским университетом им. Ю. Либиха «Microbial enzymes in biotechnology and medicine» (Kazan, 2009), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009), V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы изучения биоты Южного Урала и сопредельных территорий» (Орск, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 19 рисунков. Цитируемая литература включает 184 источника, из них 84 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил чернозем выщелоченный, отобранный на территории Буинского района Республики Татарстан. Образцы почвы отбирали с соблюдением правил асептики и помещали в стерильные пергаментные пакеты. Агрохимические показатели почвы следующие: содержание гумуса – 5,2%, азота - 0.425%, pH почвенной вытяжки – 7.3.

Оценка биологической активности почв осуществлялась по показателям ферментативной активности, активности азотфиксации и дыхания, численности основных эколого-трофических групп бактерий, качественному и количественному составу микроскопических грибов.

Определение численности бактерий и микромицетов проводили общепринятыми методами посева почвенной суспензии на селективные питательные среды [Методы..., 1991]. Численность микроорганизмов учитывали: утилизирующие органические формы азота - на мясо-пептонном агаре (МПА); утилизирующие минеральные формы азота - на среде Гаузе, образующие эндогенные споры – на смеси МПА и сусло агара (СА) после пастеризации при 70-80°C, денитрификаторы – на жидкой среде Гильтая, нитрификаторы – на жидкой среде Виноградского для первой фазы нитрификации. Численность микроорганизмов пересчитывали на вес абсолютно сухой почвы [Теппер, 2004].

Активность каталазы определялась титриметрическим методом по Колешко, дегидрогеназы – колориметрическим методом с трифенилтетразолийхлоридом (ТТХ), уреазы – колориметрически с реактивом Несслера, протеазы – колориметрически с пересчетом на глицин [Хазиев, 2005]. Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом, респираторную активность – газохроматографически [Гарусов с соавт., 1999]. Биомассу микроорганизмов определяли методом прямого счета в люминесцентном микроскопе по Звягинцеву и Кожевину [Методы..., 1991].

Учёт микроскопических грибов проводили на подкисленной среде Чапека и на картофельно-глюкозном агаре (КГА). Родовой состав микромицетов вели по соответствующим определителям. Кривые рангового распределения были построены на основе показателя частоты встречаемости (ЧВ). Для штаммов микромицетов, характеризующихся высокой ЧВ, в чистой культуре была определена радиальная скорость роста [Кураков, 2001].

С целью выявления общих закономерностей воздействия определенной дозы ТНТ на экологическое состояние почв использовали интегральный показатель биологического состояния (ИПБС) почвы. ИПБС рассчитывали по следующим показателям: численность основных эколого-трофических групп бактерий, ферментативные активности, азотфиксация и респираторная активность почвы [Колесников с соавт., 2006].

Генотоксичность почвенной вытяжки была определена в тесте Эймса и SOS-хромотесте [Ильинская, Маргулис, 2005].

Содержание доступного ТНТ и его метаболитов в ходе эксперимента определяли методом ВЭЖХ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007. Микробиологические показатели представлены в виде средних и медианных значений. Характеристикой разброса служили стандартное отклонение и 2,5 и 97,5 перцентили для медианных значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Количественный анализ физиологических групп микроорганизмов.

Чувствительность и высокая индикационная способность микроорганизмов позволяют избрать их в качестве инструмента мониторинга антропогенных изменений [Денисова с соавт., 2005; Бадмаев, Дорошкевич, 2006; Стахурлова с соавт., 2007].

Проведенные исследования показали, что внесение ТНТ в различных концентрациях не привело к существенному снижению численности группы микроорганизмов, использующих минеральный азот (рис. 1А). Воздействие тротила проявлялось в «сбое» сукцессионных циклов. Чем выше была внесенная концентрация ксенобиотика, тем более выраженным было смещение сукцессионных волн относительно незагрязненного образца.

Как видно из рисунка 1Б, на бактерии, потребляющие органический азот, тринитротолуол, напротив, оказал выраженное токсическое действие. Проявлялось это, прежде всего, в снижении количества КОЕ, высеваемых на МПА. Для этой группы бактерий отмечен дозо-зависимый эффект: низкие концентрации ТНТ оказали на гетеротрофные бактерии менее значительное влияние по сравнению с высокими. При концентрациях тротила 20 и 50 мг/кг почвы количество бактерий данной группы варьировало в пределах $2,7-13,9 \cdot 10^6$ кл/г абсолютно сухой почвы (а.с.п.). Внесение в почву более высоких концентраций тротила (100 и 200 мг/кг) привело к достоверному снижению численности гетеротрофных бактерий на протяжении всего опыта, за исключением 5-х суток.

Активность минерализационных процессов в почве оценивается величиной коэффициента микробиологической минерализации. Как следует из анализа динамики коэффициента, при загрязнении чернозема тринитротолуолом происходит интенсификация минерализационных процессов в почве (табл. 1). При этом, чем выше концентрация внесенного ксенобиотика, тем сильнее происходит нарастание процессов минерализации (значения на 12-100% выше контрольных).

При загрязнении почвы тринитротолуолом влияние его на группу спорообразующих бактерий было аналогичным по характеру влияния на аммонификаторы (рис. 1В). Для концентраций 100 и 200 мг ТНТ/кг почвы ингибирующий эффект за весь опыт составил в среднем 24 и 52% соответственно. Стоит отметить, что воздействуя по пути снижения численности спорообразующих бактерий, ТНТ в то же время не повлиял на ход сукцессии сообщества.

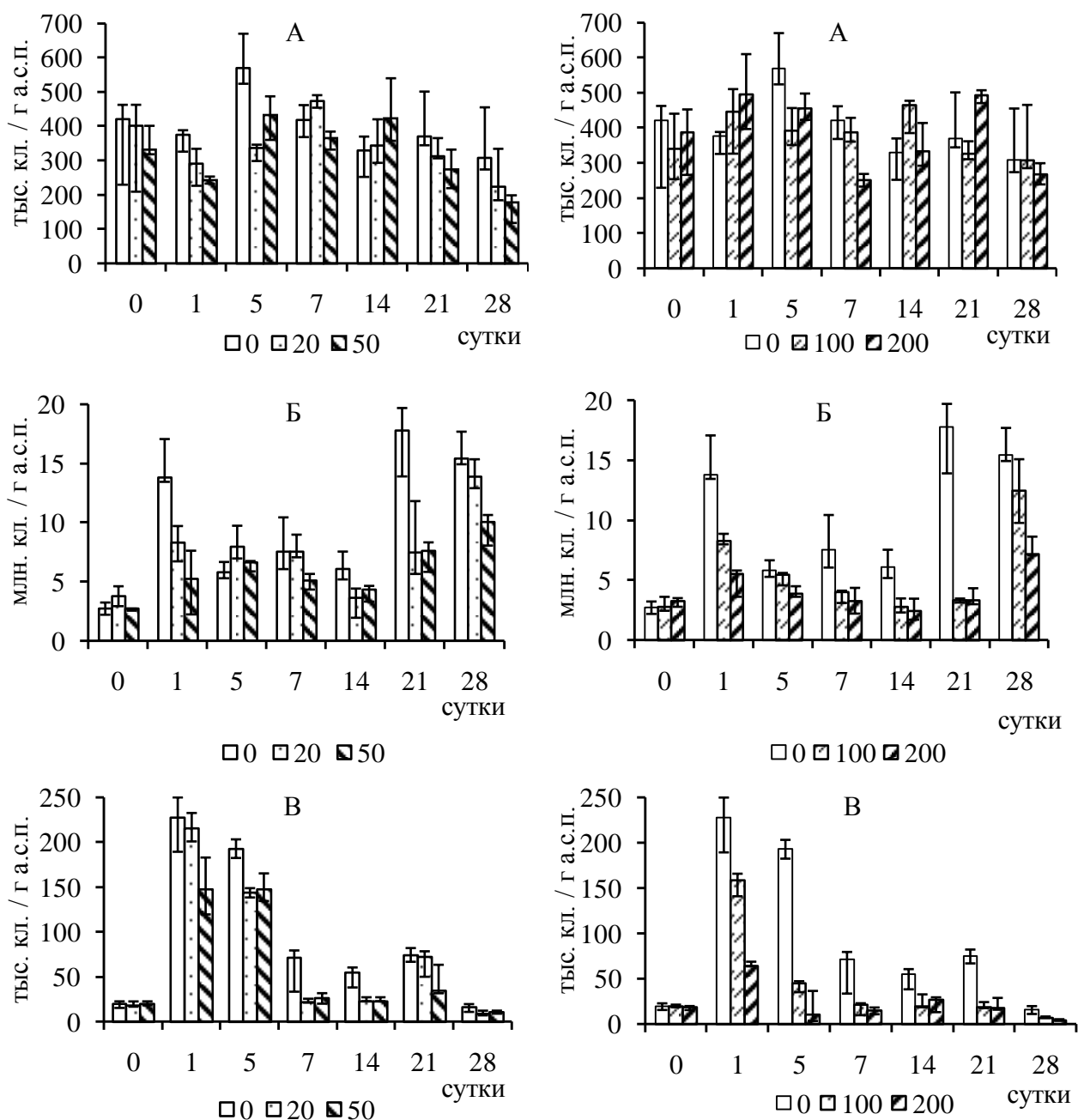


Рис. 1 Численность актинобактерий (А), аммонификаторов (Б), спорообразующих бактерий (В) при внесении ТНТ. Примеч.: зд. и далее 0, 20, 50, 100 и 200 – концентрации ТНТ (мг/кг).

Известно, что нитрифицирующие и денитрифицирующие бактерии играют важную роль в формировании и поддержании азотного режима почв. Нитрифицирующие бактерии являются агрономически важной группой микроорганизмов. Снижение их численности является одним из проявлений отрицательного воздействия на почву [Абашеева с соавт., 2001; Завьялова, Митрофанова, 2008; Киреева с соавт., 2001; Колесников с соавт., 2007].

Изменение коэффициента минерализации при внесении ТНТ

Время, сутки	Внесенное в почву количество ТНТ (мг/кг):				
	0	20	50	100	200
0	1.4	0.9	1	1.2	1.2
1	0.3	0.3	0.4	0.5	0.9
5	1	0.4	0.6	0.8	1.2
7	0.5	0.6	0.7	0.9	0.7
14	0.5	0.9	1	1.5	1.3
21	0.2	0.4	0.4	1	1.5
28	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4

По сравнению с остальными группами нитрифицирующие бактерии оказались очень чувствительны к токсическому действию ТНТ. При концентрации ксенобиотика 20 мг/кг почвы их численность не отличалась от контрольного образца на 5-, 7- и 21-е сутки (рис. 2А). При концентрации 50 мг/кг почвы количество бактерий приближалось к значениям в незагрязненном образце только на 5-е сутки, на 7-, 14- и 21-е сутки отмечена существенная разница по сравнению с вариантом без ТНТ. Высокие концентрации ТНТ (100 и 200 мг/кг) оказали на нитрификаторы более пролонгированное и выраженное негативное воздействие, снизив их численность в первую половину опыта более чем вдвое.

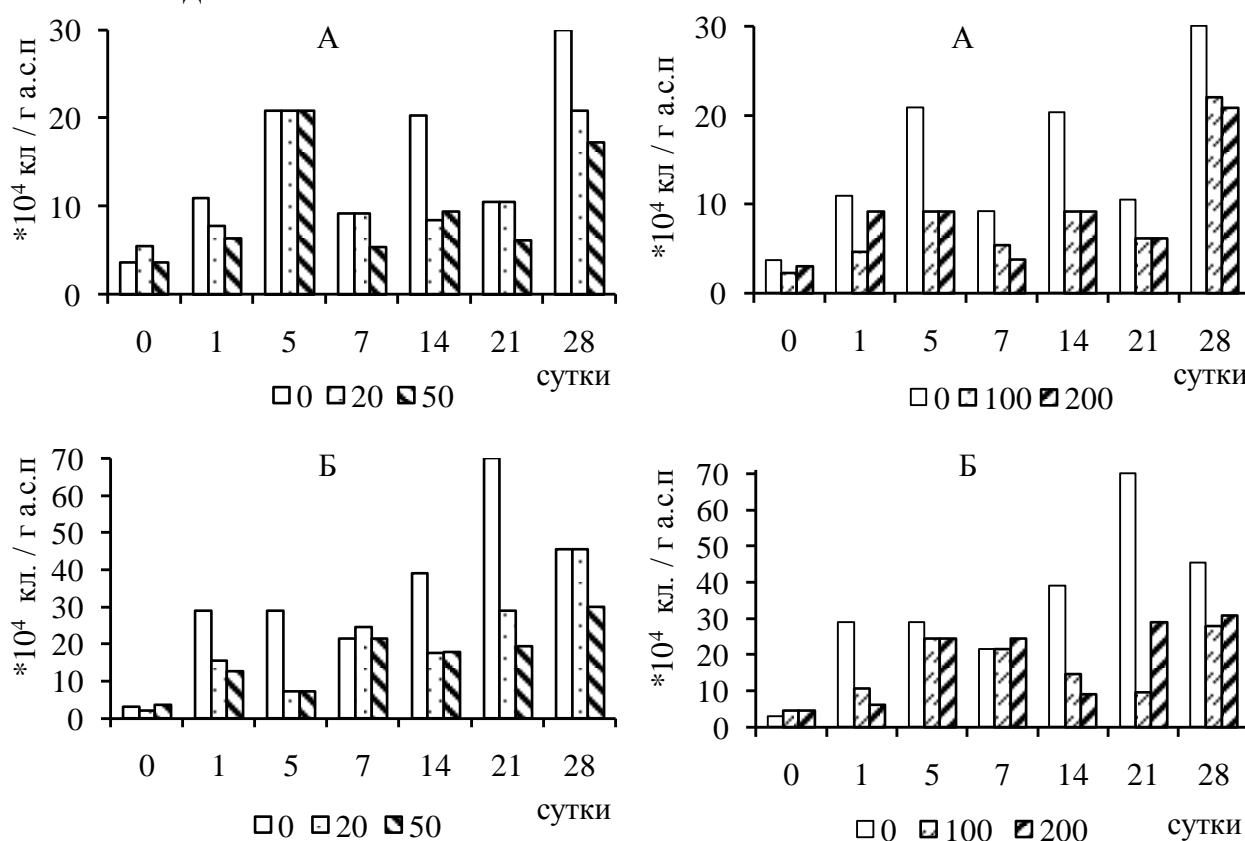


Рис. 2 Влияние ТНТ на нитрификаторы (А) и денитрификаторы (Б).

Важным этапом превращения азотсодержащих веществ в почве является восстановление окисленных форм, т.е. денитрификация. Динамика изменения численности денитрифицирующих бактерий отражена на рис. 2Б. В течение всего эксперимента, за исключением 7-х суток, в образцах, загрязненных ксенобиотиком, количество денитрификаторов было ниже, чем в контроле и степень снижения почти не зависела от концентрации ТНТ. Снижение количества денитрифицирующих бактерий происходило более чем на 30%, что говорит о нарушении тротилом сбалансированности содержания различных форм азота в почве.

Итак, в целом влияние ТНТ на эколого-трофические группы проявлялось в токсичности его высоких концентраций (100 и 200 мг/кг), которые приводили к снижению численности всех исследованных групп. Исключение составили только бактерии, развивающиеся за счет минеральных форм азота. Для них, а также для денитрификаторов и гетеротрофов, отмечено смещение хода сукцессионных волн, которое также считают одним из проявлений токсичности контаминантов [Ваккер-Коузова, 2005]. К завершению периода наблюдений (28 сутки) для большинства исследованных групп бактерий отмечается тенденция восстановления их количества во всех почвах, содержащих ТНТ.

2. Биомасса микроорганизмов почвы

Биомасса и структура сообщества являются еще одним индикаторным свойством микробных сообществ [Каширская с соавт., 2009].

Как показали результаты прямого микроскопирования, в почве контрольного образца доминирующим компонентом является вегетативный мицелий. Биомасса бактерий в незагрязненной почве варьировала в пределах $0,7-2,5 \cdot 10^{-5}$ г/г, в загрязненных образцах – от 0,5 до $2,4 \cdot 10^{-5}$ г/г и биомасса микромицетов – от 39 до $70,2 \cdot 10^{-5}$ г/г в контроле, от 7,8 до $54,6 \cdot 10^{-5}$ г/г в почве с ТНТ (табл. 2, 3). Именно мицелий оказался наиболее чувствителен к действию загрязнителя, до 14-х суток опыта его содержание в почве с ТНТ было достоверно ниже по сравнению с контролем. Только к окончанию опыта наметилась тенденция восстановления биомассы микромицетов, которая наиболее заметна была в образце, содержащем 20 мг ТНТ/кг.

При изучении динамики сухого веса бактериального населения при внесении 20 и 50 мг ТНТ/кг почвы было установлено отсутствие достоверного отличия биомассы бактерий от незагрязненного образца. При высоких концентрациях ксенобиотика (100 и 200 мг/кг) биомасса была меньше по сравнению с контролем в среднем на 30-33%. Меньшее по сравнению с микромицетами угнетение развития бактерий увеличивает соотношение биомассы этих микроорганизмов в пользу бактерий.

Табл. 2

Биомасса бактерий и микромицетов после внесения ТНТ (20 и 50 мг/кг)

Время, сутки	Биомасса, г*10 ⁻⁵ / г почвы					
	Биомасса бактерий			Биомасса микромицетов		
	0	20	50	0	20	50
0	1,03	1,03	1,04	53,6	46,8	41,7
1	2,49	2,40	2,28	70,2	54,6	45,6
5	1,56	1,29	1,20	39,0	31,2	23,4
7	2,12	2,00	1,98	66,1	39	31,2
14	1,00	1,01	0,89	42,9	46,8	25,5
21	0,88	0,90	0,80	54,6	48,36	40,6
28	0,74	0,76	0,65	58,5	50,7	43,7

Табл. 3

Биомасса бактерий и микромицетов после внесения ТНТ (100 и 200 мг/кг)

Время, сутки	Биомасса, г*10 ⁻⁵ / г почвы					
	Биомасса бактерий			Биомасса микромицетов		
	0	100	200	0	100	200
0	1,03	1,10	1,36	53,6	45,6	43,9
1	2,49	2,09	1,85	70,2	33,5	25,7
5	1,56	1,20	0,82	39,0	16,4	7,8
7	2,12	1,78	1,57	66,1	27,3	26,2
14	1,00	0,56	0,70	42,9	23,4	19,5
21	0,88	0,48	0,53	54,6	33,5	27,3
28	0,74	0,48	0,50	58,5	37,4	30,4

3. Анализ динамики ферментативных активностей. Количественные изменения, происходящие в микробном ценозе загрязненных почв, не всегда отражают изменения ее биологической активности. Ферментативная активность почв обусловлена не только различным содержанием микроорганизмов, но и их разнообразием и физиологической активностью. Поэтому для биомониторинга почв предпочтительнее совместное изучение микробиологических и ферментативных процессов [Барайщук, Хамова, 2008].

При исследовании динамики окислительно-восстановительных ферментов – каталазы и дегидрогеназы – было установлено, что до 7-х суток эксперимента образцы достоверно не отличались по уровню активностей (рис. 3А, Б). Однако и позднее ТНТ не оказывал значительного ингибирующего эффекта ни на каталазу, ни на дегидрогеназу. Максимальное ингибирование

активности ферментов составило 15-28% (с максимумом на 14-е сутки) в случае каталазы и 50-56% (с максимумом на 21-е сутки) в случае дегидрогеназы.

В почве обнаруживаются гидролитические ферментные системы, осуществляющие превращение азотсодержащих органических веществ. Важным диагностическим показателем интенсивности процессов мобилизации почвенного азота служит активность ферментов азотного цикла – протеазы и уреазы [Бадмаев, Дорошкевич, 2006]. Известно, что ароматические соединения оказывают на протеолитическую активность почв ингибирующее действие [Киреева с соавт., 2001]. Наши результаты подтверждают данное положение: в почвенных образцах с высокой концентрацией ТНТ (100 и 200 мг/кг) происходит подавление активности протеазы с начала опыта (рис. 4А). Однако внесение 20 мг ТНТ/кг почвы уже к 5м суткам вызвало повышение активности фермента на 75% по сравнению с образцом без ТНТ, и до 21 суток включительно активность протеазы была выше, чем в контроле. При внесении 50 мг ТНТ активность протеазы превышала уровень активности фермента в незагрязненном образце только на 21 сутки эксперимента.

Ингибирование активности почвенной уреазы при загрязнении ТНТ наблюдалось при всех испытанных концентрациях, за исключением 20 мг/кг (рис. 4Б). Это способствовало уменьшению и без того невысокой обеспеченности данного типа почвы минеральными соединениями азота. Самая высокая активность фермента в загрязненной почве наблюдалась к завершению опыта (28 сутки) в образце, содержащем 20 мг ТНТ/кг.

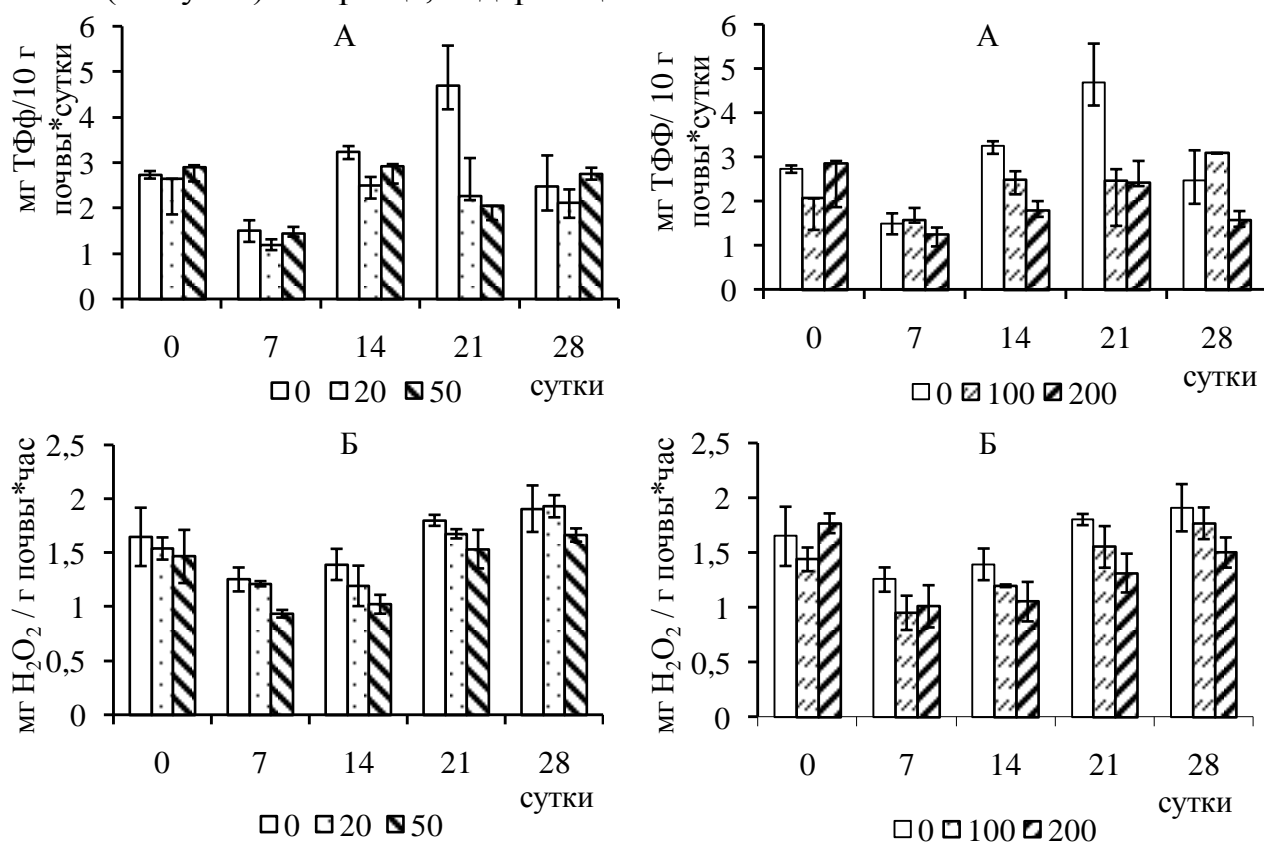


Рис. 3 Активность дегидрогеназы (А) и каталазы (Б) при внесении ТНТ

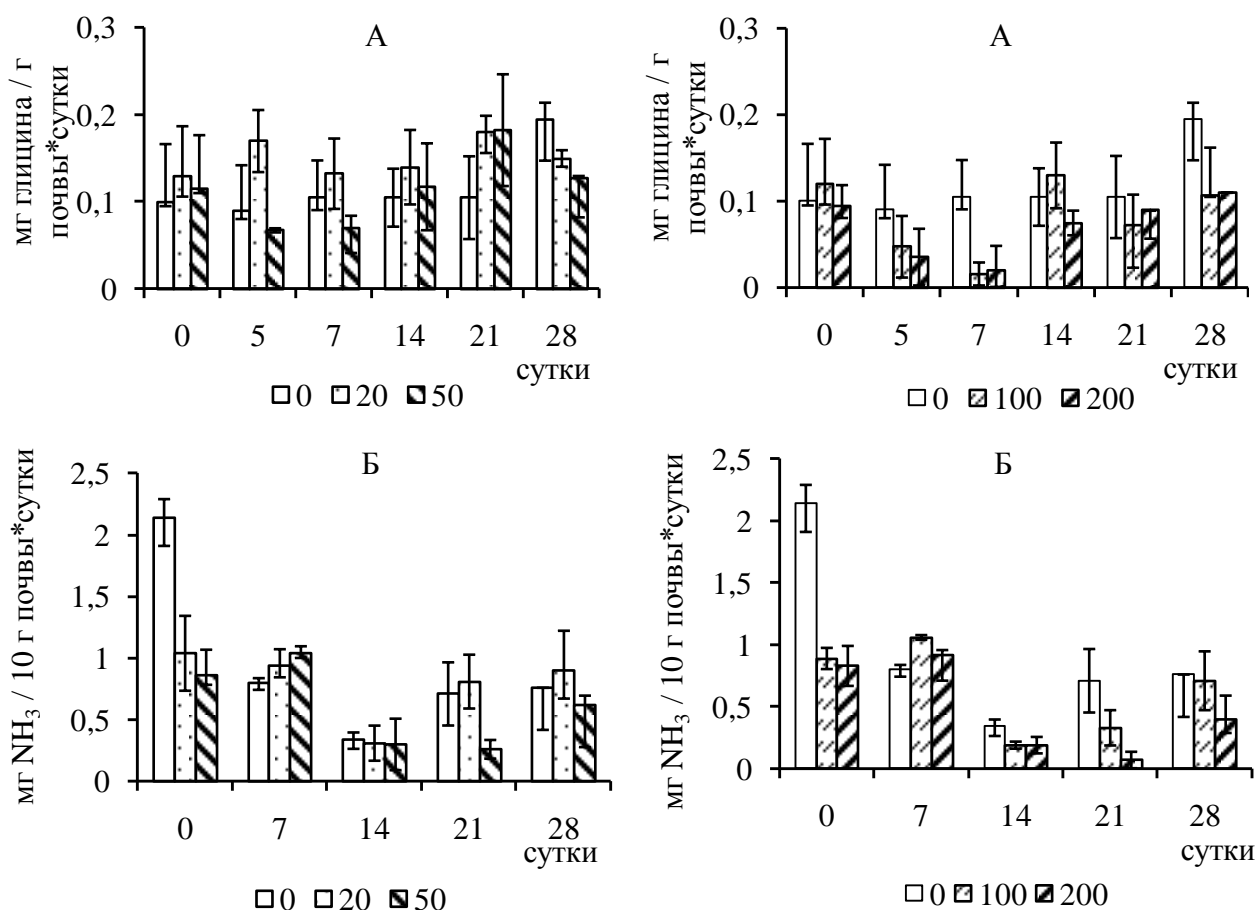


Рис. 4 Активность протеазы (А) и уреазы (Б) при внесении ТНТ

Таким образом, на гидролазы тринитротолуол оказал более выраженное токсическое действие. Крайне чувствительной к загрязнению тротилом оказалась уреаза. На момент 1-х суток активность фермента снизилась в среднем на 35-63%. Для протеазы такой же уровень ингибирования был достигнут только при внесении высоких доз поллютанта.

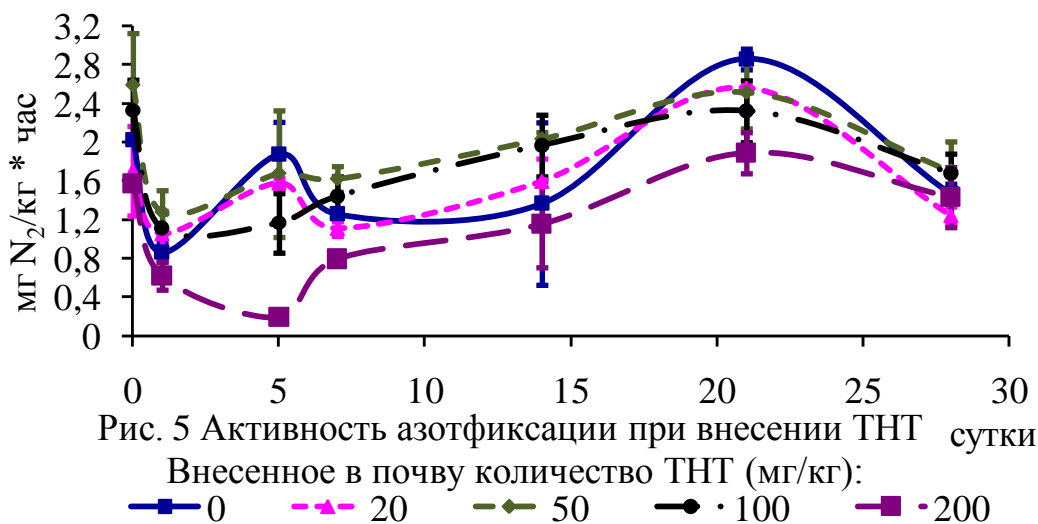


Рис. 5 Активность азотфиксации при внесении ТНТ
Внесенное в почву количество ТНТ (мг/кг):
—■— 0 -▲- 20 -◆- 50 -●- 100 -■- 200

Исследование азотфиксации (рис. 5) показало, что загрязнение почвы тротилом в концентрации 20 мг/кг достоверно не изменяет количество связанного азота. Внесение 50 и 100 мг ТНТ приводило к сглаживанию осцилляций нитрогеназной активности, как это было отмечено для

актинобактерий и денитрификаторов. Внесение 200 мг ТНТ /кг приводило не только к сглаживанию флуктуаций активности нитрогеназы, но и к ее достоверному ингибированию на протяжении всего эксперимента.

В целом, к 28-м суткам эксперимента в уровне ферментативной активности загрязненных ТНТ почв не было достоверных отличий от незагрязненной почвы для дегидрогеназы, каталазы и протеазы (за исключением образца, содержащего 200 мг ТНТ/кг). Для уреазы и нитрогеназы по уровню активности все без исключения образцы были сравнимы с контрольными.

Интегральным показателем биохимической активности почвы служит эмиссия CO_2 [Симонов, Андросов, 2008]. При измерении субстрат-индуцированного и базального дыхания было определено, что на 5-е сутки интенсивность выделения CO_2 как в контроле, так и в опыте была минимальной (рис. 6). Позднее происходило увеличение выделения CO_2 и его максимальные значения наблюдались на 21-е сутки. К 28-м суткам опытные варианты, содержащие все исследованные концентрации ТНТ, по показателю индуцированного дыхания достоверно не отличались друг от друга, в то время как базальное дыхание в загрязненной почве оказалось на 50-60% меньше по сравнению с незагрязненной. Отсутствие продолжительного ингибирования базального и индуцированного дыхания, а также снижение коэффициента микробного дыхания до 1 уже к 5-м суткам (рис. 6), позволяют сделать вывод о том, что, в целом, ТНТ не обнаружил выраженного влияния на уровень эмиссии диоксида углерода.

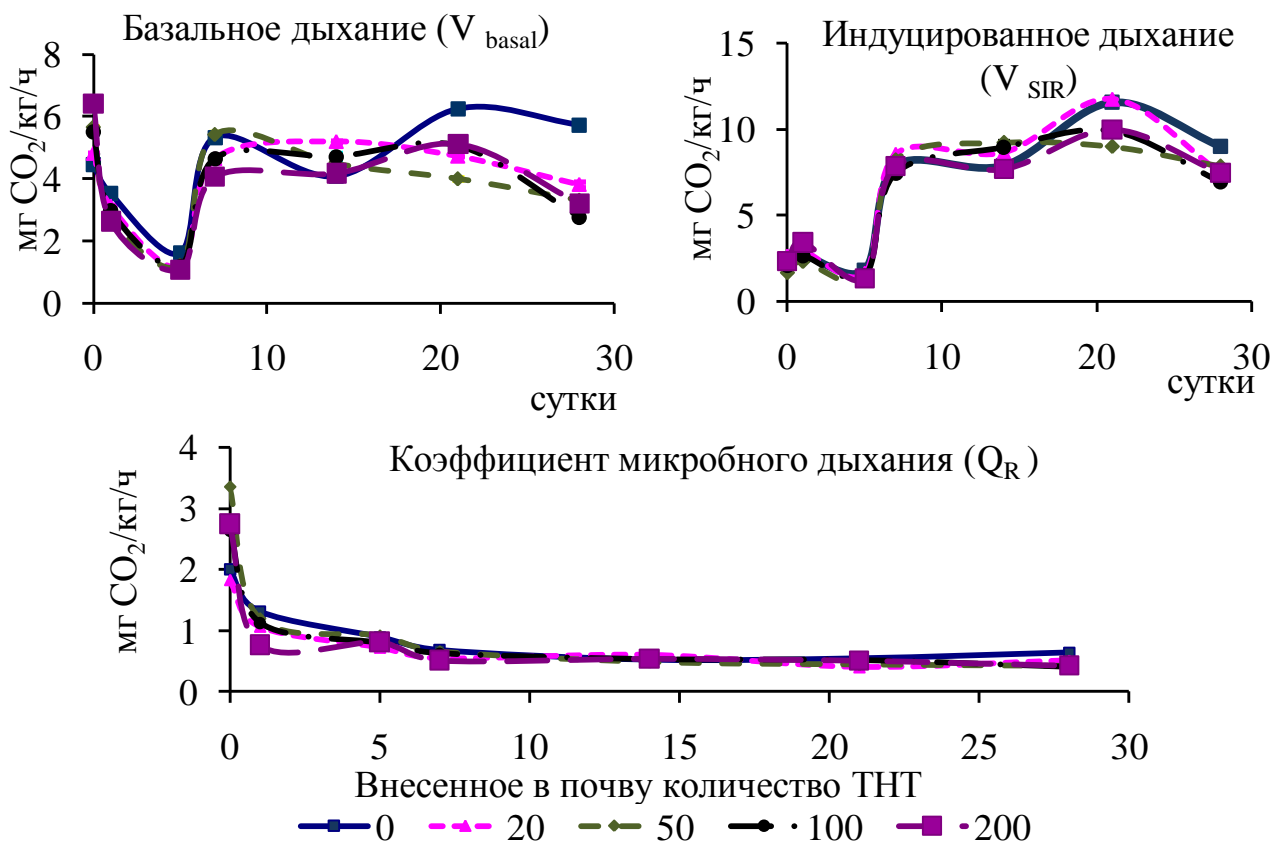


Рис. 6 Скорости базального, субстрат-индуцированного дыхания и коэффициент микробного дыхания почвы в присутствии ТНТ

4. Интегральный показатель биологического состояния почвы

Для оценки степени нарушения экологических функций почвы нами был использован интегральный показатель биологического состояния (ИПБС) почвы. Данный показатель позволяет оценить совокупность биологических показателей, интегрировать их относительные значения, абсолютные значения которых не могут быть суммированы [Колесников с соавт., 2009].

Степень снижения ИПБС напрямую зависела от концентрации ксенобиотика, внесенного в почву (рис. 7). При максимальной нагрузке поллютанта (200 мг/кг) в течение всего периода исследований наблюдалось стойкое снижение интегрального показателя более чем на 35%. Влияние остальных концентраций носило волнообразный характер с максимальным снижением в первую неделю и на 21 сутки со стремлением к восстановлению к окончанию эксперимента.

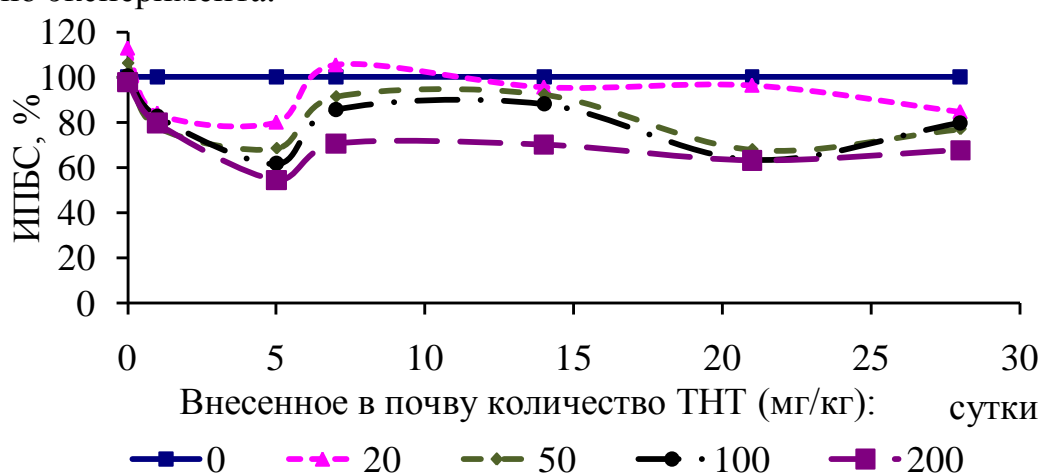


Рис. 7 Изменение ИПБС почвы после внесения ТНТ

5. Структура комплекса микромицетов при воздействии ТНТ

Чисто количественная оценка действия антропогенных факторов на сообщество не может считаться достаточной. В связи с этим нами была проведена оценка качественных изменений комплекса микромицетов.

Родовой состав грибов в незагрязненной почве (табл. 4) был представлен 41 различным родом. Своеобразие комплекса заключалось в отсутствии доминантов, только у рода *Penicillium* ЧВ превысила 60%.

При наименьшей нагрузке поллютанта (20 мг/кг) разнообразие штаммов сократилось на 25%. По мере возрастания концентрации ТНТ на фоне продолжающегося уменьшения количества родов, которое происходило за счет исчезновения редких и случайных родов (рис. 8, 9), постепенно увеличивалась доля доминирующих и типично частых родов.

В образцах, содержащих более существенные концентрации ксенобиотика — 50 и 100 мг/кг — не были обнаружены следующие грибы: *Wardomyces*, *Zygosporium*, *Halobyssus*, *Absidia*, *Nigrospora*, *Scolecobasidium* и роды *Scedosporium*, *Mucor*, *Monocillium*, *Doratomyces* (табл. 4). Следует отметить, что одновременно увеличилась ЧВ возбудителей заболеваний *Cephalosporium* и *Fusarium* и микромицетов родов *Aspergillus* и *Sporotrichum*.

Табл. 4 Частота встречаемости микромицетов, %

К	Внесенное количество ТНТ (мг/кг):			
	20	50	100	200
<i>Absidia</i> - 28	<i>Absidia</i> -28			
<i>Acremonium</i> – 8	<i>Acremonium</i> – 8			
<i>Alternaria</i> - 12	<i>Alternaria</i> - 12			
<i>Aspergillus</i> - 20	<i>Aspergillus</i> - 28	<i>Aspergillus</i> - 36	<i>Aspergillus</i> – 48	<i>Aspergillus</i> - 72
<i>Aureobasidium</i> -8	<i>Aureobasidium</i> -8			
<i>Cephalosporium</i> - 24	<i>Cephalosporium</i> -20	<i>Cephalosporium</i> -28	<i>Cephalosporium</i> -40	<i>Cephalosporium</i> -64
<i>Chaetomium</i> - 16	<i>Chaetomium</i> -20	<i>Chaetomium</i> -16	<i>Chaetomium</i> -8	
<i>Cladosporium</i> -20	<i>Cladosporium</i> -8			
<i>Coniothyrium</i> -20	<i>Coniothyrium</i> -20	<i>Coniothyrium</i> -8	<i>Coniothyrium</i> 16	
<i>Doratomyces</i> - 8	<i>Doratomyces</i> -8		<i>Culvularia lunata</i> -8	<i>Culvularia lunata</i> -20
<i>Funseceae</i> - 16				
<i>Fusarium</i>-24	<i>Fusarium</i>-36	<i>Fusarium</i>-68	<i>Fusarium</i>-92	<i>Fusarium</i>-100
<i>Geomyces pannorus</i> -56	<i>Geomyces pannorus</i> -56	<i>Geomyces pannorus</i> -52	<i>Geomyces pannorus</i> -80	<i>Geomyces pannorus</i> -100
<i>Sporotrichum pruinosum</i>-40	<i>Sporotrichum pruinosum</i>-56	<i>Sporotrichum pruinosum</i>-64	<i>Sporotrichum pruinosum</i>-80	<i>Sporotrichum pruinosum</i>-100
	<i>Geotrichum</i> -24	<i>Geotrichum</i> -20		<i>Gilmaniella</i> -20
<i>Halobysus</i> -16	<i>Halobysus</i> -16			
<i>Hormiscium</i> -56	<i>Hormiscium</i> -48	<i>Hormiscium</i> -52	<i>Hormiscium</i> -32	<i>Hormiscium</i> -20
<i>Humicola</i> -28	<i>Humicola</i> -20	<i>Humicola</i> -16	<i>Humicola</i> -12	<i>Humicola</i> -16
<i>Microascus</i> -28				
<i>Monocillium</i> -44	<i>Monocillium</i> -24	<i>Monocillium</i> -8		
<i>Mortierella</i> -52	<i>Mortierella</i> -36	<i>Mortierella</i> -40	<i>Mortierella</i> – 20	<i>Mortierella</i> -20
<i>Mucor</i> -8	<i>Mucor</i> -8	<i>Mucor</i> -8		
<i>Nigrospora</i> -16	<i>Nigrospora</i> -16			
<i>Ostracoderma</i> -8			<i>Paecilomyces</i> -28	
<i>Paecilomyces</i> -48	<i>Paecilomyces</i> -40	<i>Paecilomyces</i> -36		
<i>Penicillium</i> -68	<i>Penicillium</i> –68	<i>Penicillium</i>-68	<i>Penicillium</i> -64	<i>Penicillium</i>-76
<i>Phialophora</i> - 16				
<i>Pulularia</i> -20				
<i>Scedosporium</i> -20	<i>Scedosporium</i> -20	<i>Scedosporium</i> -8		<i>Rhinocladium</i> -28
<i>Sclerotinia</i> -8				<i>Ramichoridium</i> – 24
<i>Sepidonium</i> -20	<i>Scolecobasidium</i> -20			
<i>Scolecobasidium</i> -20				
<i>Scopulariopsis</i> 36	<i>Scopulariopsis</i> -40	<i>Scopulariopsis</i> -44	<i>Scopulariopsis</i> -24	
<i>Sporotrichum</i> -36	<i>Sporotrichum</i> -40	<i>Sporotrichum</i> -40	<i>Sporotrichum</i> 44	<i>Sporotrichum</i> 44
<i>Stemphileium</i> -8	<i>Sepidonium</i> -16			
<i>Trichoderma</i> -36	<i>Trichoderma</i> -40	<i>Trichoderma</i> -36	<i>Trichoderma</i> -36	<i>Trichoderma</i> -44
<i>Trichotecium</i> -8				
<i>Tilocladium</i> -8				
<i>Ulocladium</i> -8				
<i>Verticillium</i> -8	<i>Verticillium</i> -12			
<i>Wardomyces</i> -8	<i>Wardomyces</i> -8			
<i>Zygosporium</i> -8	<i>Zygosporium</i> -8			

Жирным выделены роды микромицетов, проявившие устойчивость к загрязнению ТНТ

В почве, содержащей 200 мг/кг ТНТ, количество родов уменьшилось по сравнению с контрольным вариантом на 25. Вместе с тем, появились, ранее не обнаруженные представители родов *Rhinocladium*, *Ramichoridium* и *Gilmaniella*, *Fusidium*, *Culvularia*. В образце, загрязненном максимальной концентрацией ксенобиотика, ЧВ некоторых из фитопатогенных родов достигла 100%. Следствием возрастания ЧВ вышеперечисленных родов стало увеличение доли микроорганизмов, обладающих фитотоксическими свойствами. В дальнейшем это может привести к накоплению микотоксинов и усугублению негативного эффекта загрязнителя [Гузев с соавт., 1985].

Одним из подходов характеристики структуры комплекса микромицетов является анализ соответствия относительного распределения ЧВ микромицетов различным математическим моделям [Кураков, 2001; Левин, Гузев, 1987]. Распределение по ЧВ в почвенных образцах с 20 и 50 мг ТНТ/кг, несмотря на выявленные изменения, было близко к каноническому лог-нормальному типу (рис. 9 а, б). Для образцов, загрязненных 100 и 200 мг ТНТ/кг почвы, было характерно распределение по типу геометрического ряда (рис. 9 в, г).

Таким образом, возрастание концентрации ТНТ приводит к нарушению состава микробоценоза, а именно к размножению нескольких устойчивых форм, которые дают скачок численности. Для понимания этих процессов была исследована радиальная скорость роста этих микромицетов. Для определения радиальной скорости роста были отобраны микромицеты, относящиеся к родам *Fusarium*, *Aspergillus* и 2 штамма – к роду *Penicillium*. Изучаемые культуры различаются как по абсолютным значениям скоростей роста, так и по пределам толерантности к ТНТ. Более высокая (в 2-6 раз) средняя линейная скорость роста *Fusarium sp.* указывает на выраженность г-стратегических свойств. Благодаря свойствам г-стратега микромицеты рода *Fusarium* оказались более устойчивы к действию 2,4,6-тринитротолуола.

Как и *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.2* оказался не способен расти при концентрациях 100, 150 и 200 мг/л ксенобиотика. Однако при концентрациях 20 и 50 мг/л ТНТ, скорость роста *Aspergillus sp.* была выше практически в 2 раза скорости роста *Penicillium sp.2*. Из исследованных микромицетов устойчивостью средней степени обладал *Penicillium sp.1*, колонии которого росли при всех исследованных концентрациях тринитротолуола. *Fusarium sp.* благодаря высокой скорости роста образовывал колонии при всех исследованных концентрациях ксенобиотика, за исключением 200 мг/л. Торможение микромицета было наименьшим по сравнению с микромицетами других родов (рис. 10). Таким образом, при воздействии ТНТ на почву, сообщество микромицетов обогащается штаммами микромицетов, обладающими свойствами г-стратегов.

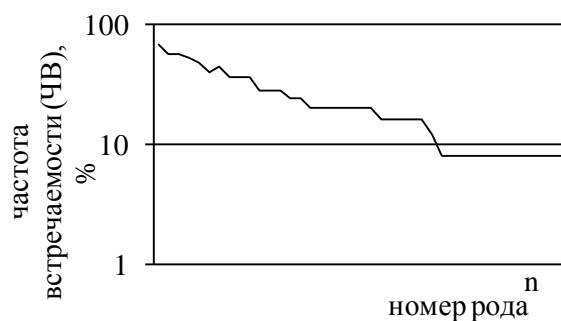


Рис. 8 Ранговое распределение частоты встречаемости (ЧВ) микромицетов в незагрязненном образце (логарифмическая шкала).

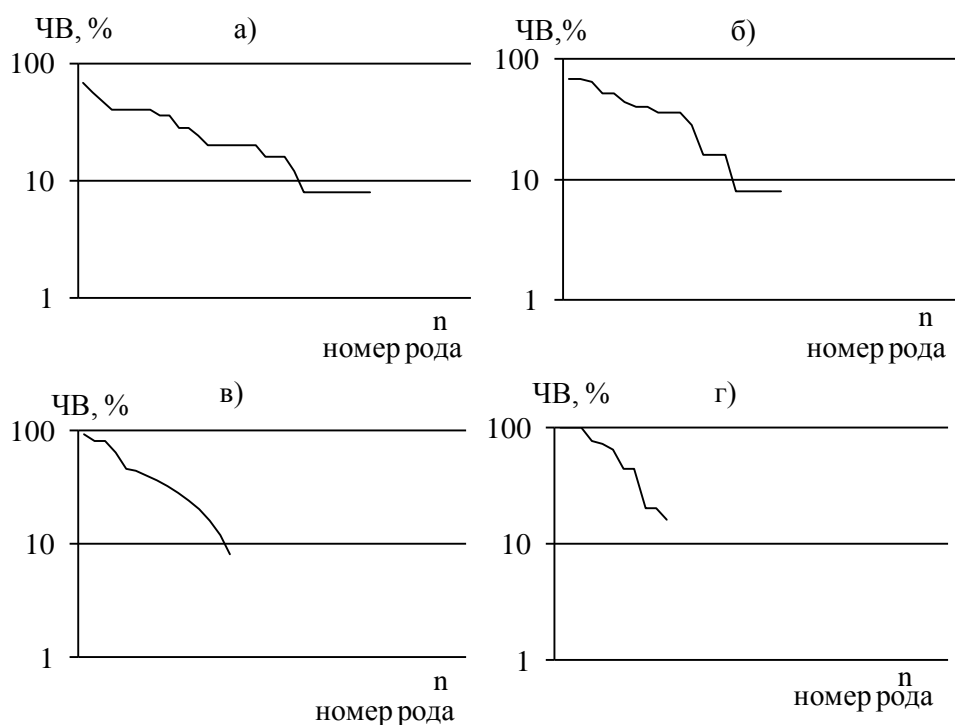


Рис. 9 Ранговое распределение частоты встречаемости микромицетов в образцах, содержащих ТНТ:

(а) 20 мг/кг; (б) 50 мг/кг; (в) 100 мг/кг и (г) 200 мг/кг.

Для оценки действия тротила в отношении микромицетов были использованы два показателя: ED_{50} – представляющий собой концентрацию вещества, необходимую для 50% подавления роста колоний грибов и ED_{95} – представляющий концентрацию вещества, необходимую для практически полного подавления роста колоний грибов.

Как видно из рис. 11, по чувствительности указанные микромицеты можно расположить следующим образом: *Aspergillus sp.* > *Penicillium sp.1* > *Penicillium sp.2* > *Fusarium sp.*

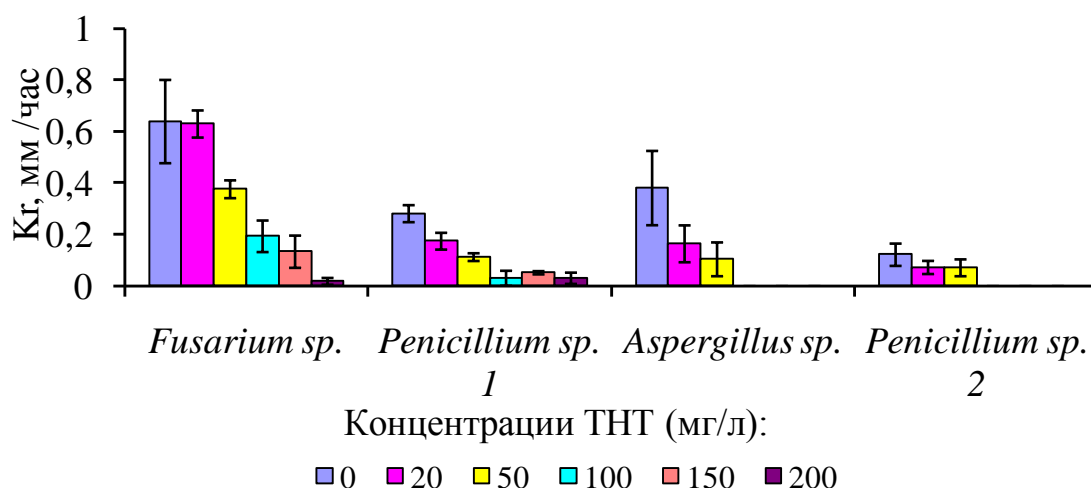


Рис. 10 Влияние ТНТ на радиальную скорость роста (Kr) доминирующих микромицетов

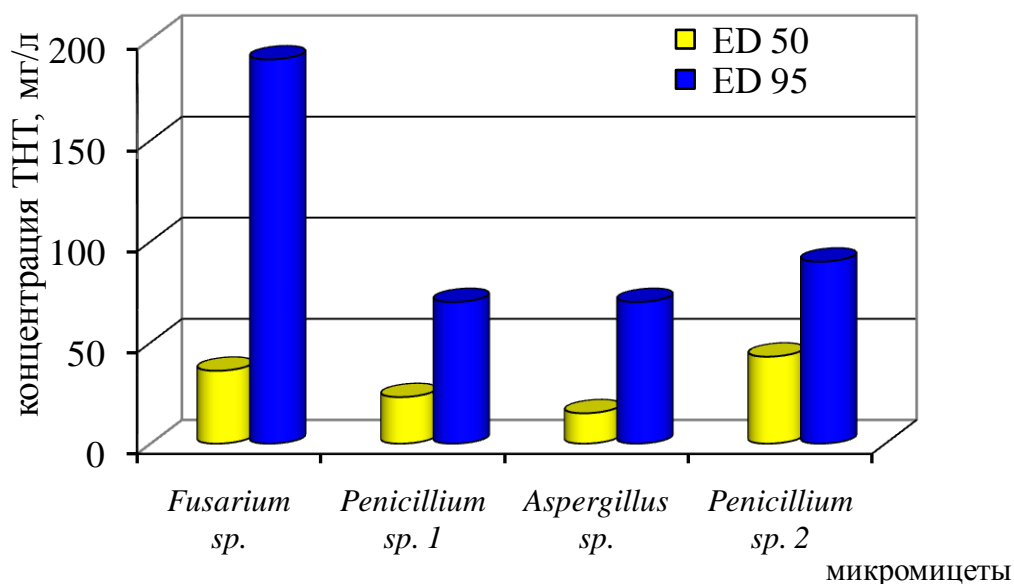


Рис. 11 Чувствительность доминирующих микромицетов к 2,4,6-тринитротолуолу

6. Оценка генотоксических свойств почвенных экстрактов

Для интегральной оценки здоровья почвы мы исследовали генотоксичность почвы, загрязненной тринитротолуолом. При оценке способности индуцировать мутации у тестерного штамма *Salmonella typhimurium* TA 100 при воздействии опытных образцов почвенной вытяжки значимого превышения числа ревертантов выявлено не было (рис. 12).

SOS-хромотест (рис. 13) также показал отсутствие генотоксичности у почвенного экстракта за исключением максимальной нагрузки ксенобиотика в момент его внесения. Таким образом, при загрязнении почвы тринитротолуолом в диапазоне концентраций 20-200 мг/кг почвы доступная для живых организмов часть ксенобиотика не проявляет мутагенной активности ни в тесте Эймса, ни в SOS-хромотесте.

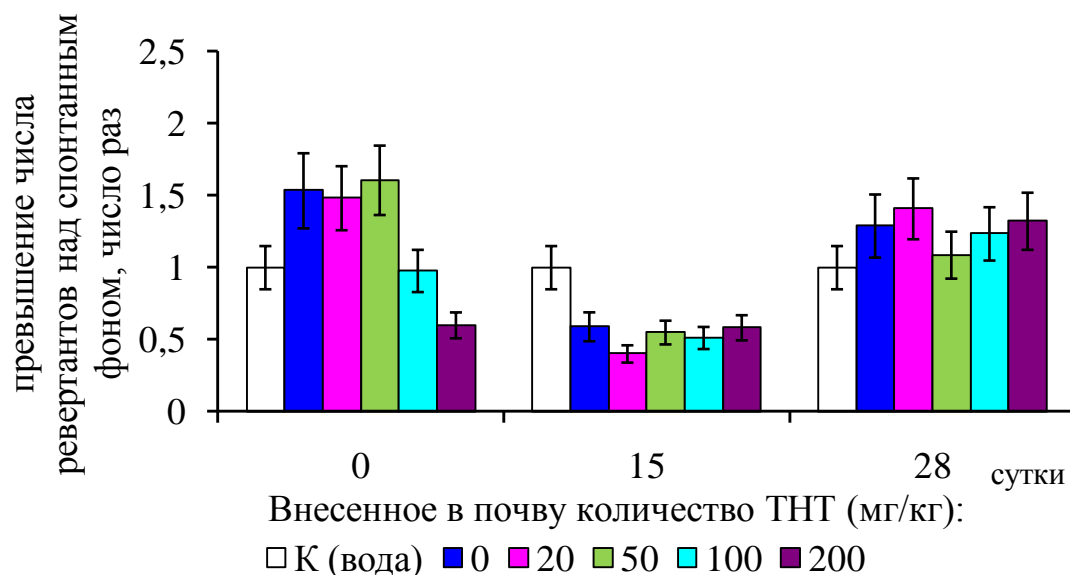


Рис. 12 Оценка генотоксичности почвенных экстрактов в тесте Эймса

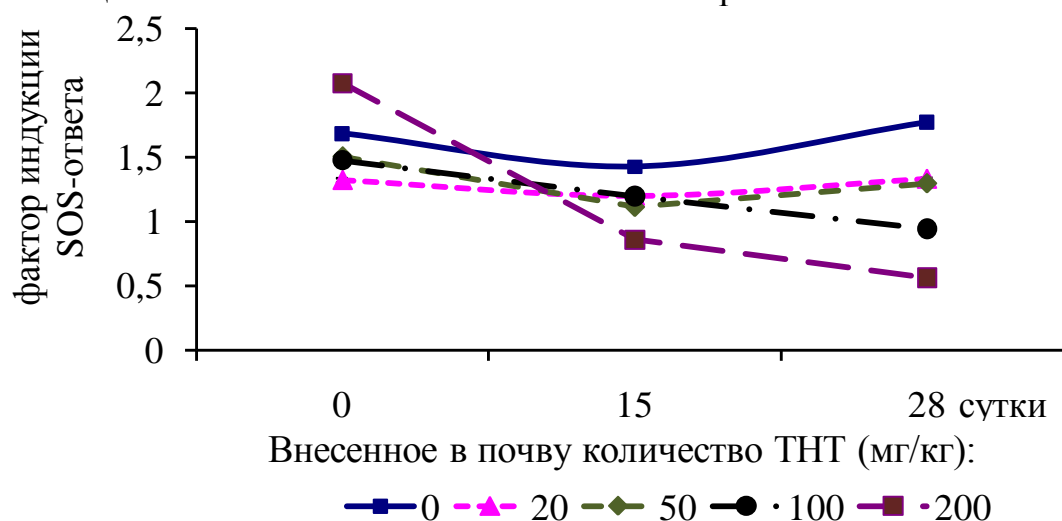


Рис. 13 Индукция SOS-ответа водными экстрактами почвы, содержащими ТНТ

7. Динамика содержания 2,4,6-тринитротолуола и его метаболитов

Как видно из табл. 5 А, Б, в ходе инкубирования концентрация ТНТ, определенная в водном и ацетонитрильном почвенных экстрактах, постоянно снижалась. Как показывает анализ полученных данных, доступной оставалось небольшая часть внесенного ТНТ. Так, через несколько часов после внесения водой удавалось извлечь 2,8-3,7% (из образцов с 20 и 50 мг ТНТ) и не более 15,5% (из образцов с 100 и 200 мг ТНТ) от внесенного количества ТНТ. Уже на 15 сутки в образцах почв, в которые было внесено 20 и 50 мг ТНТ, он не детектировался в водных экстрактах. То же было на 28 сутки в образцах, содержащих 100 и 200 мг ТНТ. Для ацетонитрильных экстрактов количество экстрагированного ТНТ, вначале равное 27-39% к окончанию опыта составляло 3,5-6,15% (табл. 5 Б).

Определение продуктов метаболизма показало, что среди них основными оказались 4-аминодинитротолуол (4-АДНТ) и 2-

аминодинитротолуол (2-АДНТ). Снижение количества экстрагируемого ТНТ сопровождалось повышением концентрации 2-АДНТ и 4-АДНТ (табл. 6А, Б).

Таблица 5

Содержание 2,4,6-тринитротолуола, экстрагируемого водой (А) и ацетонитрилом (Б)

А	Время, сутки	Внесенное в почву количество ТНТ (мг/кг):				
		0	20	50	100	200
	0	0	0.56	1.85	15.5	23.51
	15	0	0	0	2.64	2.93
	28	0	0	0	0	0

Б	Время, сутки	Внесенное в почву количество ТНТ (мг/кг):				
		0	20	50	100	200
	0	0	6.47	19.61	27.33	58.89
	15	0	2.59	7.47	7.44	30.68
	28	0	0	1.75	6.15	10.46

Таблица 6

Содержание основных метаболитов ТНТ в водных (А) и ацетонитрильных экстрактах (Б) почвы

А	Время, сутки	Внесенное в почву количество ТНТ (мг/кг):				
		0	20	50	100	200
	0	0	0/0*	2,92 /9,1	7,4/ 14,3	19,3 /2,1
	15	0	0	0	0 / 1,3	2,3 / 8,2
	28	0	0	0	0	0 /1,8

*Примечание: 2-аминодинитротолуол / 4- аминодинитротолуол

Б	Время, сутки	Внесенное в почву количество ТНТ (мг/кг):				
		0	20	50	100	200
	0	0	0 /0	0/0	0,3 / 0,9	1,1 / 0,9
	15	0	2,8 / 6,9	2,8 / 6,6	31,6/ 67,5	45,9/ 100
	28	0	5,5 / 11,4	0,8 / 1,5	1,8 / 2,5	51,3 / 146

Из проведенных исследований экспериментального загрязнения чернозема выщелоченного 2,4,6-тринитротолуолом следует, что воздействие ТНТ на биологическую активность почвы не проявлялось в жестком и непреодолимом подавлении какой-либо группы микроорганизмов. К окончанию периода наблюдений большинство показателей, составляющих биологическую активность загрязненной почвы, продемонстрировало способность к восстановлению. Исключение составил только опытный вариант, содержащий

200 мг ТНТ/кг почвы, моделирующий очаг загрязнения, содержащий кристаллический ТНТ. Экстраполируя результаты исследований на загрязнение ТНТ *in situ* можно сделать вывод, что при отсутствии возобновления загрязнения из-за растворения кристаллов тротила в очаге загрязнения сообщество микроорганизмов почвы способно справиться с токсическим стрессом.

ВЫВОДЫ

1. Степень резистентности эколого-трофических групп микроорганизмов почвы к 2,4,6-тринитротолуолу убывает в ряду: актинобактерии > спорообразующие бактерии > аммонификаторы > нитрификаторы > денитрификаторы > микромицеты. Коэффициент минерализации увеличивается в диапазоне концентраций 50-200 мг ТНТ/кг в 1,3-7,5 раза по сравнению с контролем. 2,4,6-тринитротолуол оказывает негативное влияние на биомассу бактерий почвы только в концентрации 200 мг/кг, снижая ее на 25-47%. В диапазоне концентраций 50-200 мг/кг 2,4,6-тринитротолуол отрицательно влияет на развитие микромицетов, уменьшая их биомассу на 37-60%.

2. 2,4,6-тринитротолуол ингибирует отдельные этапы цикла азота, снижая интенсивность азотфиксации, разложения мочевины и аммонификации белков, но не приводит к существенному снижению активности каталазы, дегидрогеназы и не снижает интенсивность дыхания.

3. 2,4,6-тринитротолуол оказывает отрицательное воздействие на иерархическую структуру комплекса микромицетов, снижая разнообразие комплекса и увеличивая долю родов, содержащих фитопатогенные, сапротрофные и условно патогенные для человека микромицеты - *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cephalosporium*.

4. Водные экстракты почвы, загрязненной 2,4,6-тринитротолуолом, обладали слабой способностью индуцировать SOS-ответ у тестерного штамма *Escherichia coli* PQ37 только в концентрации ксенобиотика 200 мг/кг в момент его внесения. В тесте Эймса мутагенные эффекты водных экстрактов почвы, загрязненной 2,4,6-ТНТ (20-200 мг/кг), не обнаружены.

5. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что непосредственно после внесения в почву 2,4,6-тринитротолуол на 60-70% связывается с ее компонентами. Количество экстрагируемого ацетонитрилом ксенобиотика в течение месяца снижается от 30-40% до 0-6%, что связано с его сорбцией и частичной микробной трансформацией, зарегистрированной по увеличению содержания продуктов нитровосстановления.

6. Проведенные исследования позволяют заключить, что при отсутствии возобновления загрязнения сообщество микроорганизмов способно справиться с токсическим стрессом, вызванным загрязнением почвы 2,4,6-тринитротолуолом в концентрации, не превышающей 100 мг/кг почвы. При наличии в почве ТНТ в количестве, превышающем его растворимость, на первом этапе целесообразно проведение предварительной ремедиации с использованием инженерно-экологических методов.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Шинкарев А.А. Подготовка экспериментальных образцов почвы при изучении внутрипочвенной трансформации 2,4,6-тринитротолуола / А.А. Шинкарев, И.П. Демидова, Г.Ю. Яковлева, В.Н. Будников, Б.М. Куриненко // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2008. – Т.150, кн. 3. – С. 103-111.
2. Кормильцева И.П. Влияние 2,4,6-тринитротолуола на биологическую активность чернозема выщелоченного / И.П. Кормильцева, Г.Ю. Яковлева, А.В. Гарусов, Н.Г. Захарова, Б.М. Куриненко // Вестник ОГУ. – 2010. - № 6 (112). – С. 119-124.
3. Kurinenko B.M. The toxic action of 2,4,6-trinitrotoluene on *Pseudomonas fluorescens* B-346 / B.M. Kurinenko, G.Yu. Yakovleva, R.E. Davidov, I.P. Demidova // Microbial diversity: current situation, conservation strategy and biotechnological potential: Proceedings of III International conference. – Perm, 2008. - P.169.
4. Yakovleva G.Y. Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene toxic effect in relation to *Bacillus subtilis* SK1 under glutathione / G.Y. Yakovleva, I.P. Demidova, R.R. Hamzina, N.V. Subbotina, N.V. Kalacheva, B.M. Kurinenko // Abstracts of the XIV International Conference «Microbial enzymes in biotechnology and medicine».- Kazan, 2009. - P.84.
5. Demidova I.P. Dynamics of nitrogenase activity in soil under 2,4,6-trinitrotoluene pollution / I.P. Demidova, N.A. Arbuzova, S.S. Zemskaya, G.Y.Yakovleva, N.G. Zaharova, B.M. Kurinenko // Abstracts of the XIV International Conference «Microbial enzymes in biotechnology and medicine».- Kazan, 2009. - P. 74.
6. Кормильцева И.П. Динамика протеазной и уреазной активностей чернозема выщелоченного при загрязнении 2,4,6-тринитротолуолом / И.П. Кормильцева, Н.Г. Захарова, Г.Ю. Яковлева, Б.М. Куриненко // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. – М.: МАКС Пресс, 2009. – С.90.
7. Кормильцева И.П. Реакция микромицетов чернозема выщелоченного на загрязнение 2,4,6-тринитротолуолом / И.П. Кормильцева, Г.Ю. Яковлева, Н.Г. Захарова, Б.М. Куриненко // V Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой»: материалы конференции. - Саратов: Научная книга, 2010. – С. 57.
8. Кормильцева И.П., Изменение структуры комплекса микромицетов чернозема выщелоченного при внесении 2,4,6-тринитротолуола in vitro / И.П. Кормильцева, Г.Ю. Яковлева, Н.Г. Захарова, Б.М. Куриненко // Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы изучения биоты Южного Урала и сопредельных территорий»: Материалы конференции – Орск: Издательство ОГТИ, 2010 – С. 31.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008 г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, Отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне.

Факс: (843) 238-76-01